



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Минклуха-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12. E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

27.01.2016 № 153-214.5-67

на № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ:

Заместитель
директора
д.ф.м.н. Ефремов Р.Г.
27 января 2016 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

Диссертация «Биологическая активность новых компонентов змеиных ядов: анализ с использованием культуры трансформированных нейроэндокринных клеток РС12» выполнена в Отделе молекулярных основ нейросигнализации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

В период подготовки диссертации соискатель **Макарова Яна Владиславовна** являлась аспирантом и младшим научным сотрудником в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук в Отделе молекулярных основ нейросигнализации.

В 2002 г. окончила Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет по специальности микробиология.

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в 2015г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институтом биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель:

Уткин Юрий Николаевич, доктор химических наук, руководитель лаборатории молекулярной токсикологии, Отдела молекулярных основ нейросигнализации Федерального

государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

По итогам обсуждения на совместном заседании лаборатории молекулярной токсикологии и лаборатории лиганд – рецепторных взаимодействий Отдела молекулярных основ нейросигнализации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук было принято следующее заключение:

В диссертации Макаровой Я.В. «Биологическая активность новых компонентов змеиных ядов: анализ с использованием культуры трансформированных нейроэндокринных клеток PC12» соблюдены основные требования, предъявляемые к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

Конкретное личное участие автора в получении научных результатов.

Основные результаты работы были получены либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов, обработку оформление и публикацию полученных данных. Обсуждение, интерпретация и анализ результатов исследований, формирование структуры диссертации, формулировка основных положений диссертации проводилось совместно с научным руководителем.

Степень достоверности результатов, проведенных соискателем учёной степени исследований.

Выводы, представленные в данной работе, полностью подтверждены экспериментальными данными. Все эксперименты выполнены в нескольких повторах. Достоверность полученных результатов подтверждена данными статистической обработки и не вызывает сомнений. Используемые методики исследования и проведенные расчеты корректны и статистически достоверны.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем учёной степени.

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях. В опубликованных материалах и автореферате достаточно полно изложено основное содержание диссертации.

Статьи в журналах:

1. Макарова Я.В., Осипов А.В., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н., Влияние фосфолипаз А2 из ядов змей на рост нейритов и выживаемость клеточной линии PC12 феохромоцитомы крысы, Биохимия 71 (2006) 838-846.
2. Osipov A.V., Kasheverov I.E., Makarova Y.V., Starkov V.G., Vorontsova O.V., Ziganshin R.K., Andreeva T.V., Serebryakova M.V., Benoit A., Hogg R.C., Bertrand D., Tsetlin V.I., Utkin Y.N., Naturally occurring disulfide-bound dimers of three-fingered toxins: a paradigm for biological activity diversification, J. Biol. Chem. 283 (2008) 14571-14580.
3. Osipov A.V., Filkin S.Y., Makarova Y.V., Tsetlin V.I., Utkin Y.N., A new type of thrombin inhibitor, noncytotoxic phospholipase A2, from the Naja haje cobra venom, Toxicon 55 (2010) 186-194.

4. Tsai I.H., Wang Y.M., Cheng A.C., Starkov V., Osipov A., Nikitin I., Makarova Y., Ziganshin R., Utkin Y., cDNA cloning, structural, and functional analyses of venom phospholipases A₂ and a Kunitz-type protease inhibitor from steppe viper *Vipera ursinii renardi*. *Toxicon* 57 (2011) 332-341.

Патент:

Осипов А.В., Филькин С.Ю., Макарова Я.В., Уткин Ю.Н. Прямой ингибитор тромбина, обладающий антипролиферативным действием. Патент РФ № 2369615 от 10.10.2009.

Результаты работы также были представлены на 6 отечественных и 5 зарубежных конференциях.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите.

Представленная Макаровой Яной Владиславовной диссертационная работа посвящена исследованию действия новых белков из ядов змей на клеточную линию PC12. Тема и содержание диссертации соответствуют специальности 03.01.04 Биохимия, по которой рекомендуется к защите. Тема диссертации утверждена ученым советом ИБХ РАН (18.03.2015 г., протокол №2).

Актуальность темы и направленность исследования.

Работа Макаровой Я.В., изложенная в ее диссертации «Биологическая активность новых компонентов змеиных ядов: анализ с использованием культуры трансформированных нейроэндокринных клеток PC12» посвящена исследованию биологической активности белков змеиных ядов, с использованием линии нейроэндокринных клеток PC12. Яды змей, проявляющие ярко выраженные биологические эффекты, являются сложными белковыми смесями. Развитие новых методов выделения и анализа позволяет обнаружить новые белки, присутствующие в ядах в крайне малых количествах. Анализ биологической активности таких белков также значительно упрощается при использовании клеточных культур.

Таким образом, для установления или подтверждения механизмов действия новых белков, выделяемых из ядов змей, актуальным является исследование их эффектов на клеточных линиях. Наиболее подходящими для этого являются трансформированные клеточные линии: они относительно легко пролиферируют, сохраняют способность к миграции и дифференцировке; вещества, для которых будет показано влияние на такой тип клеток, могут оказаться ценными инструментами для изучения поведения опухолей, а также в качестве основы для разработки новых диагностических и лекарственных средств.

Белковые компоненты, исследованные в данной работе, являются представителями трех различных структурно-функциональных семейств, преобладающих в ядах змей: металлопротеиназы, трёхпетельные токсины и фосфолипазы A₂.

Новизна и ценность результатов, полученных лично автором в ходе научного исследования. Практическая значимость диссертации и использование полученных результатов.

При изучении металлопротеиназы оксиагина из яда кобры *Naja oxiana* впервые обнаружена способность протеиназ этого типа откреплять клетки PC12 от субстрата с последующей их кластеризацией. Взаимоотношения между клетками и компонентами

экстрацеллюлярного матрикса служат основополагающим фактором в событиях, происходящих при инвазии опухоли и в механизмах ангиогенеза. Имеющиеся в литературе данные для родственных металлопротеиназ свидетельствуют, что эти белки селективно ингибируют клеточную адгезию опухолевых клеток. Таким образом, оксиагин может представлять интерес для исследований в области онкологии.

Исследование трехпетельных токсинов показало, что альфа-нейротоксины ядов кобр не оказывают сколько-нибудь заметного влияния на клетки феохромоцитомы, в то время как цитотоксины проявляют значительную цитотоксичность. Изучение выделенных из яда кобры *Naja kaouthia* природных гетеродимерных форм трехпетельных токсинов, содержащих цитотоксин и альфа-кобротоксин, показало полное отсутствие цитотоксической активности у гетеродимеров. Это необычное свойство, очевидно возникшее вследствие димеризации, наряду со способностями димеров связываться с нейрональными никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами делает их уникальными инструментами при изучении последних в исследовании лиганд-рецепторных взаимодействий.

При изучении фосфолипаз А₂ (ФЛА₂) змеиных ядов была установлена их способность вызывать дифференцировку клеток РС12 феохромоцитомы крысы. Исследование молекулярных механизмов этого процесса показало наличие двух путей, посредством которых ФЛА₂ инициируют рост нейритов. Один из них включает ферментативный гидролиз липидов и проявляется в случае ФЛА₂ с высокой ферментативной активностью. Второй путь не зависит от ферментативной активности ФЛА₂ и, возможно, включает участие протеинкиназ. В практическом плане полученные для ФЛА₂ данные могут являться предпосылками для более детального изучения механизмов, приводящих к дифференцировке опухолевых клеток, и послужить фундаментальной основой для создания лекарственных препаратов, направленных на подавление роста опухоли, или для использования дифференцирующей способности ФЛА₂ при лечении нейрональных повреждений и нейродегенеративных заболеваний.

Работа выполнена на высоком экспериментальном и методологическом уровне, обладает новизной и представляет практический интерес для исследователей в данной области.

Предполагаемые оппоненты:

Чеботарева Наталья Александровна, доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», ведущий научный сотрудник лаборатории структурной биохимии белка.

Хомутов Алексей Радиевич, доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений.

Предполагаемая ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук.

Диссертация «Биологическая активность новых компонентов змеиных ядов: анализ с использованием культуры трансформированных нейроэндокринных клеток РС12» Макаровой Яны Владиславовны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Заключение принято на совместном заседании лаборатории молекулярной токсикологии и лаборатории лиганд – рецепторных взаимодействий Отдела молекулярных основ нейросигнализации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Присутствовало на заседании 13 человек. Результаты голосования: "за" - 13 человек, "против" – 0 человек, "воздержалось" - 0 человек, протокол N 1 от 06 июля 2015г.

Председатель совместного семинара
лабораторий, научный сотрудник лаборатории
лиганд - рецепторных взаимодействий
к.х.н.

Жмак М.Н.

Секретарь совместного семинара,
научный сотрудник лаборатории молекулярной
токсикологии к.б.н.



Шелухина И.В.